



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO  
PROSTŘEDÍ**

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

**SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ CHLOROFYLU**

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CHLOROPHYLL

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Petra Rábová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**

**BRNO 2018**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1055/2016  
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Studentka: **Petra Rábová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie a technologie ochrany životního prostředí  
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**  
Akademický rok: 2017/18

### Název bakalářské práce:

Spektrofotometrické stanovení chlorofylu

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma stanovení chlorofylu různými analytickými metodami; detailní popis aplikace spektrofotometrie.
2. Praktická část – nasazení ekotoxikologického testu s následným posouzením účinku vybrané ekotoxikologické sloučeniny prostřednictvím zvoleného endpointu – množství chlorofylu a biomasy.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 21.5.2018

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Petra Rábová  
student(ka)

-----  
Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce je zaměřena na stanovení chlorofylu v listech metodou extrakční spektrofotometrie. Teoretická část přináší informace o fotosyntéze, stresových faktorech či adaptaci rostlin, dále o fotosyntetických pigmentech (zejména chlorofylu-*a*) a aplikaci spektrofotometrie a dalších metod stanovení chlorofylu. Experimentální část se zaměřuje na nasazení ekotoxikologického testu a především jeho vyhodnocení dvěma nezávislými metodami. Konkrétně se jednalo o stanovení inhibice růstu biomasy a nově o spektrofotometrické stanovení množství chlorofylu. Výsledky mezi sebou navzájem korelují, a proto se stanovení chlorofylu jeví jako vhodné rozšíření obvyklých vyhodnocovacích metod ekotoxikologických testů.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis is focused on determination of chlorophyll in leaves by the method of extraction spectrophotometry. The theoretical part provides information about photosynthesis, stress factors or plant adaptation, photosynthetic pigments (especially chlorophyll-*a*) and application of spectrophotometry and other methods of chlorophyll determination. The experimental part is focused on the application of the ecotoxicological test and, above all, it is evaluation by two independent methods. Specifically, it was determination of biomass growth inhibition and newly spectrophotometrical determination of chlorophyll mass. The results correlate with each other, therefore, the determination of chlorophyll seems to be an appropriate extension of usual evaluation methods of ecological tests.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Fotosyntéza, chlorofyl, fotosyntetické pigmenty, *Lemna minor*, spektrofotometrie

## **KEY WORDS**

Photosynthesis, chlorophyll, photosynthetic pigments, *Lemna minor*, spectrophotometry

RÁBOVÁ, P. *Spektrofotometrické stanovení chlorofylu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 40 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své práce Ing. Veronice Řezáčové, Ph.D. za cenné rady a konzultace, odborné vedení a pomoc při zpracování této práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině za oporu a trpělivost, kterou mi po celou dobu studia a práce věnovali.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>8</b>
2.1	<i>Fotosyntéza.....</i>	8
2.1.1	Zdroj energie .....	8
2.1.2	Listy.....	9
2.1.3	Chloroplasty .....	9
2.1.4	Světlá fáze fotosyntézy.....	10
2.1.5	Fotosystémy .....	11
2.1.6	Temná fáze fotosyntézy .....	11
2.1.7	Fluorescence.....	12
2.1.8	Vlivy na průběh fotosyntézy .....	12
2.1.9	Charakterizace fotosyntézy .....	13
2.2	<i>Chlorofyl-a.....</i>	13
2.2.1	Struktura.....	13
2.2.2	Vlastnosti a reakce .....	14
2.2.3	Výskyt a využití .....	15
2.3	<i>Ostatní pigmenty .....</i>	15
2.3.1	Chlorofyl-b.....	15
2.3.2	Chlorofyl-c .....	16
2.3.3	Karotenoidy.....	16
2.3.4	Fykobiliny .....	17
2.4	<i>Stresové faktory a adaptace rostliny.....</i>	18
2.4.1	Teplotní stres .....	18
2.4.2	Vodní stres.....	18
2.4.3	Znečištění atmosféry .....	19
2.4.4	Nepříznivé půdní faktory .....	19
2.4.5	Biotické faktory.....	19
2.4.6	Působení toxických látek.....	19
2.5	<i>Stanovení chlorofylu-a .....</i>	20
2.5.1	Stanovení fluorimetricky.....	20
2.5.2	Separace metodou HPLC .....	21
2.5.3	Metoda průtokové injekční analýzy .....	21
2.6	<i>Spektrofotometrické stanovení chlorofylu-a.....</i>	22
2.6.1	Kvantitativní analýza.....	22
2.6.2	Kvalitativní a vícesložková analýza .....	22
2.6.3	Instrumentace .....	23
2.6.4	Extrakční spektrofotometrie .....	24
<b>3</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>26</b>
4.1	<i>Rostlinný materiál a seznam chemikálií.....</i>	26

Rostliny .....	26
Chemikálie .....	26
4.2 Použité vybavení a přístroje.....	26
4.2.1 Příprava ekotoxikologického testu a extrakce.....	26
4.2.2 Analýza pigmentu .....	26
4.3 Postup stanovení .....	27
4.3.1 Příprava ředící vody (Steinbergův roztok) .....	27
4.3.2 Nasazení testu.....	27
4.3.3 Extrakce rozpouštědlem .....	29
4.3.4 Stanovení chlorofylu spektrofotometricky .....	29
4.3.5 Test inhibice růstu okřehku menšího <i>Lemna minor</i> .....	29
<b>5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>30</b>
5.1 Porovnání extrakce ethanolem a acetonem .....	30
5.2 Výsledky extrakce chlorofylu.....	30
5.3 Výsledky testu inhibice růstu okřehku .....	32
5.4 Porovnání růstové inhibice a obsahu chlorofylu .....	34
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>35</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>36</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>40</b>

# 1 ÚVOD

Chlorofyly jsou pigmenty nacházející se v prokaryotních i eukaryotních organismech. Řadí se mezi nejdůležitější fotosyntetické pigmenty, absorbující záření v intervalu od 400 do 700 nm. V jednotlivých organismech se vyskytují různé typy chlorofylů – chlorofyl-*a*, chlorofyl-*b*, chlorofyl-*c* a další. Chlorofyl-*a* je nejdůležitější při přeměně energie záření a má hlavní podíl ve fotochemických dějích. Ostatní fotosyntetické pigmenty, a to chlorofyly a karotenoidy jsou pomocné a přenášejí zachycenou energii na chlorofyl-*a*.

Pokud je organismus vystaven nepříznivým podmínkám, dochází ke spuštění sledu adaptačních reakcí. Dlouhodobé působení stresového faktoru může vést až k úhynu organismu. Z hlediska znečištění životního prostředí se jedná především o působení látek, jejichž výskyt je v prostředí nežádoucí. Dopady znečištění se kromě úhynu organismu projevují například mutagenitou, ovlivněním reprodukce a růstu rostlin nebo změnami obsahu chlorofylu. Těchto faktů lze využít v ekotoxikologických testech.

Obsahem práce je literární rešerše na téma vlastnosti a možnosti stanovení chlorofylu-*a* a provedení ekotoxikologického testu, který byl nasazen na vodní plovoucí rostlinu, okřehek menší (*Lemna minor*). Po dobu sedmi dnů byl okřehek vystaven účinku různých koncentrací dichromanu draselného. Po ukončení expozice byly listky zpracovány a následně byla stanovena koncentrace pigmentu. Množství chlorofylu-*a* je možné stanovit více analytickými metodami. Vlastnosti chlorofylu-*a* a jeho dobrá rozpustnost v organických rozpouštědlech umožňují provést stanovení metodou extrakční spektrofotometrie.

## **2 TEORETICKÁ ČÁST**

### **2.1 Fotosyntéza**

Fotosyntéza je jedním z nejdůležitějších procesů v živé přírodě. Jedná se o složitý proces, který je tvořen velkým počtem reakcí a dějů. Schopnost vykonávat fotosyntézu je charakteristická pro fotoautotrofní organismy (sinice, řasy). Při fotosyntéze dochází k zachytu energie ze záření, která je následně použita k syntéze organických látek a kyslíku z látek anorganických. Tyto reakce lze rozdělit na dvě základní skupiny dějů – děje primární a sekundární [1].

#### **2.1.1 Zdroj energie**

Hlavním zdrojem energie pro fotosyntézu v přírodě je sluneční záření. Na povrchu Slunce je teplota 5 800 K. Slunce vyzařuje elektromagnetické vlnění. Na Zemi dopadá sluneční záření skládající se ze tří složek – ultrafialové, viditelné a infračervené.

Světlo, tedy záření v oblasti viditelné, je v intervalu vlnových délek od 380 do 740 nm. V tomto intervalu leží maximum vyzařované energie kolem 500 nm i maximální hustota toku fotonů kolem 620 nm. Pro fotosyntézu je využívána energie fotonů v oblasti od 400 do 700 nm. Záření v této oblasti je označeno termínem fotosynteticky aktivní radiace (FAR či PAR z anglického ekvivalentu). Záření infračervené, tedy záření v oblasti nad 740 nm, je člověkem vnímáno jako teplo. Záření ultrafialové je z oblasti pod 380 nm a je z větší části absorbováno ozonovou vrstvou.

Rostliny utvářejí svou vnější stavbu podle množství a složení slunečního záření na místě svého výskytu. Vnitřní struktura, vývojové a metabolické procesy jsou podřízeny světelným podmínkám. Souborný název pro tyto reakce je fotomorfogeneze. Záření, které je fotomorfogeneticky účinné, přesahuje FAR.

Kontakt se zářením zajišťují nadzemní části rostlin. U většiny rostlin je z hlediska absorpce záření rozhodující plocha listu. Dopadající záření může být rostlinou odraženo (reflexe), propouštěno (transmise) či absorbováno. Absorpce záření je nezbytná pro látkové přeměny. Energii, která vstupuje do životních dějů, tvoří však jen malá absorbovaná část. Při deexcitaci je část absorbované energie vyzařována v infračervené oblasti a jen malá část je do okolí převedena formou záření v oblasti viditelné – formou fluorescence. Energie je přeměněna na teplo, které je využito k přeměně vody na vodní páru. Formou vodní páry je uvolňováno do okolí jako teplo výparné. Tento děj je označován termínem transpirace. Jedná se o děj důležitý, protože zajišťuje výdej tepla, a tím přirozenou tepelnou cirkulaci. Rostlina je takto ochlazována. Tato energie je také hnací silou transportu vody s rozpuštěnými látkami tzv. transpirační tok [2].



### 2.1.2 Listy

Listy mají hlavní význam při látkové výměně, transpiraci vody a při fotosyntéze. Jedná se o ploché postranní orgány, značně variabilní. List je složen z čepele a řapíku. Svrchní část čepele je u většiny listu odlišná od spodní části. Povrch listu kryje pokožka, kterou tvoří ploché buňky epidermis. Součástí pokožky listu jsou průduchy, papily a trichomy. Hustota průduchů je dle druhů odlišná. Na jeden  $\text{mm}^2$  jich může být až několik set. K odstranění přebytečné vody z listu slouží skuliny – hydatody. Tyto vodní kanálky se nacházejí na špičce listu. Pletivo listů je nazýváno termínem mezofyl. U bifaciálních listů je členěn na dvě části – svrchní a spodní parenchym. U monofaciálních listů je svrchní parenchym po obou stranách listu a uprostřed je parenchym houbový. Buňky svrchního parenchymu, jiným termínem buňky palisádové, jsou protáhlé a obsahují velké množství chloroplastů. V prostředním parenchymu, houbovém, se nachází podstatně méně chloroplastů. Je tvořen laločnatými buňkami a obsahuje mezibuněčné prostory pro výměnu vody a plynů.

Žilnatina neboli nervatura je tvořena souborem cévních svazků. V listech se nachází několik typů žilnatin. U jednoděložných rostlin je převládající žilnatina rovnoběžná. Žilky vedou podélně celou strukturou listu. Žilnatina zpeřená a dlanitá se vyskytuje zejména u dvouděložných rostlin [3].

### 2.1.3 Chloroplasty

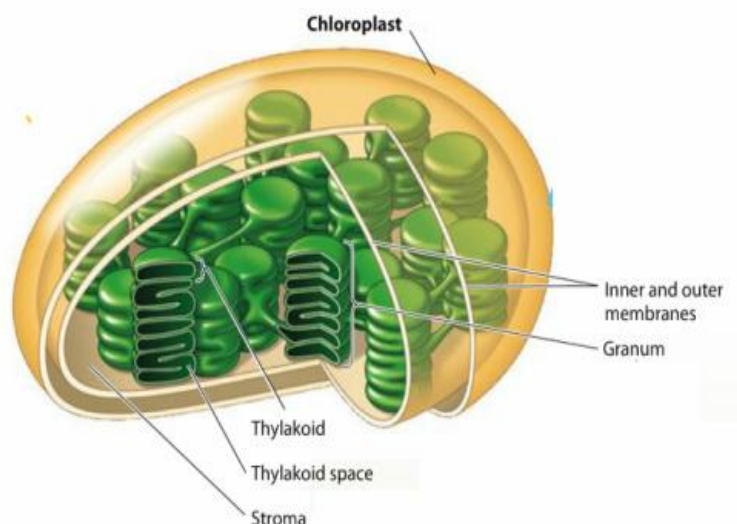
Celý proces fotosyntézy probíhá v organelách – chloroplastech (viz Obrázek 1). Jedná se o nejmenší strukturní jednotky, které jsou schopné absorbovat záření, fixovat oxid uhličitý a vestavit uhlík do sacharidů [4].

V buňce se nacházejí různé tvary chloroplastu. U vyšších rostlin je tato organela nejčastěji elipčitá či oválná. Délka chloroplastu je 4 až 6  $\mu\text{m}$ . Od okolního prostoru buňky je chloroplast oddělen dvojitou membránou. Vnější membrána je hladká a dává chloroplastu příslušný tvar. Vnitřní membrána je několikanásobně zaškrcována do plochých váčků, které jsou nazývány termínem tylakoidy. Ty tvoří uvnitř složitou strukturu paralelně uspořádaných lamel tzv. grana. Některé tylakoidy se mohou svým vnějším povrchem dotýkat výplně chloroplastu (stromatu) – tylakoidy stromatální. Kvantosom, který je centrem fotosyntézy, je tvořen komplexem enzymů a pigmentů. Obsahuje až 300 molekul chlorofylů a 48 molekul karotenoidů. Schopnost provádět fotosyntézu je podmíněna spojením dvou až čtyř kvantosomů [4][5].

Poloha chloroplastů se dle intenzity osvětlení mění. Při nadměrném osvětlení jsou chloroplasty v zákrytu podél stěny buňky. Při slabší intenzitě osvětlení leží podél buněčné stěny a při neozářené fázi jsou náhodně rozptýleny v objemu celé buňky [5].

Chemické složení chloroplastů je v sušině 35 až 55 % bílkovin (převážně enzymy) a 20 až 30 % lipidů. Produkty fotosyntézy, sacharidy, tvoří 5 až 10 %. Z 9 % jsou v chloroplastech

zastoupeny fotosyntetické pigmenty, z nichž až 75 % tvoří chlorofyl-*a*. V menším množství jsou zastoupeny nukleové kyseliny a minerální látky (fosfor, železo, hořčík, měď, mangan a zinek) [5].



Obrázek 1: Struktura chloroplastu [6]

#### 2.1.4 Světla fáze fotosyntézy

Jedná se o fotochemický děj, který přímo závisí na energii záření. Důležitým aparátem uskutečňujícím světlou fází je aparát fotosyntetizující, který je tvořen u všech typů fototrofů ze tří částí. První část, fotoreceptory, slouží k tvorbě pigmentů absorbujících záření. Fotosyntetické reakční centrum zajišťuje excitaci elektronů absorbovaným zářením. Poslední částí je řetězec oxidoreduktáz, které přeměňují energii excitovaných elektronů na energii chemickou [7].

Světla fáze fotosyntézy se skládá ze čtyř procesů:

- fotochemická excitace fotoreceptorů – absorpce slunečního záření molekulami chlorofylu s výsledkem vzniku excitovaných elektronů. Molekuly chlorofylu se nacházejí v kvantosomech tylakoidů. Molekuly pigmentu jsou vázány na molekuly speciálních bílkovin, aby byly správně nasměrovány a mohly tak nejlépe předávat absorbovanou energii. Jejich prostřednictvím je uskutečněn přenos nashromážděné energie na molekulu chlorofylu-*a* v reakčním centru.
- fotooxidace vody
- fotoredukce  $\text{NADP}^+$

- fotofosforylace – část energie excitovaných elektronů je při tomto spřaženém ději využita k tvorbě ATP. Tento děj provádí ATP-syntetáza, která je součástí tylakoidové membrány [7].

### 2.1.5 Fotosystémy

Fotosystémy jsou složeny z centrální části, nazývané reakční centrum, a světlosběrného proteinpigmentového komplexu LHC (light-harvesting complex). Tento komplex zachytí záření ve formě fotonů a získanou excitační energii elektronů přenesou do reakčního centra fotosystému, zodpovědného za fotofosforylaci [8].

#### Fotosystém I (PSI)

Fotosystém I je složen z fotosyntetických pigmentů, které jsou vázány na bílkoviny. Obsahuje reakční centrum P700, které je nazýváno podle molekuly chlorofylu-*a*, absorbující záření o vlnové délce 700 nm. Dále obsahuje světlosběrný komplex LHC, který se skládá z několika struktur bílkovin a proteinů. LHC, po získu elektronů, redukuje  $\text{NADP}^+$  na  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . PSI se nachází v membránách chloroplastů [5][8].

#### Fotosystém II (PSII)

Fotosystém II je tvořen komplexem bílkovin, nacházejících se v membránách chloroplastů. Tento komplex katalyzuje rozklad vody za tvorby molekuly kyslíku, proto se jedná o fotosyntézu oxygenní. Fotosystém II obsahuje několik transmembránových polypeptidů, které nesou některé prostetické skupiny. Mezi ně patří železo na bílkovinách D1 a D2, pigment reakčního centra P680 (tedy molekulu chlorofylu-*a* absorbující záření o vlnové délce 680 nm), feofytin a plastochinon. Tyrozin, nacházející se na bílkovině D1, slouží jako donor elektronů. Elektron je po separaci elektrického náboje excitací P680 odevzdán přes feofytin a D1 až na bílkovinou D2 vázaný plastochinon.

Fotosystémy se od sebe v několika aspektech liší. Poměr pigmentů chlorofyl-*a* ku chlorofylu-*b* je v PSI 6 : 1, v PSII je menší, přibližně 2 : 1. Lokalizace komplexu PSII je na vnitřních stranách tylakoidů grana. Na vnějších stranách těchto membrán probíhá tvorba ATP a  $\text{NADPH} + \text{H}^+$ . Oproti tomu PSI je umístěn v tylakoidech stromatálních [8].

### 2.1.6 Temná fáze fotosyntézy

V sekundární fázi fotosyntézy jsou produkty světlé fáze ( $\text{NADPH}$  a ATP) využity k redukcí kyseliny 3-fosfoglycerové na monosacharidy – triózy. Kyselina 3-fosfoglycerová vzniká v různých částech rostliny. Vznik této kyseliny je možný několika způsoby. Tím nejdůležitějším je vznik při fixaci oxidu uhličitého v chloroplastu, který vede k nárůstu množství organicky vázaného uhlíku.

Tento proces je několika fázový. První část je navázání oxidu uhličitého na fosforylovaný monosacharid tvořen pěti uhlíky (ribulóza-1,5-bisfosfát). Důležitým enzymem této reakce je Rubisco. Výsledkem je nestálý meziprodukt, tvořený šesti uhlíky, který předchází vzniku dvou molekul kyseliny 3-fosfoglycerové.

Následně probíhá redukce kyseliny 3-fosfoglycerové na triózu, 3-fosfoglyceraldehyd. Tento proces je dvoukrokový. V první fázi je fosforylace, při které je použito ATP ke vzniku kyseliny 1,3-bisfosfoglycerové. V dalším kroku je pak redukována na 3-fosfoglyceraldehyd. Po izomerizaci vzniká ketonická forma, dihydroxyacetonfosfát. Poté dochází k transportu fosforylovaných trióz z chloroplastů do cytoplazmy, kde mohou být využity v dalších metabolických drahách. Část trióz zůstává v chloroplastu a slouží k regeneraci substrátu pro Rubisco [2].

### 2.1.7 Fluorescence

Využití energie excitovaného stavu ve fotochemických procesech není jedinou možností. Může docházet ke dvěma dalším způsobům uvolnění energie. Kromě tepelné ztráty lze energii uvolnit formou emise záření. Délka excitovaného stavu je velmi krátká. Do základního stavu se molekula chlorofylu vrátí po uplynutí  $10^{-12}$  až  $10^{-9}$  sekund. K emisi záření dochází v případě, kdy jsou fotosyntetické membrány nějak porušeny např. působením nadměrného záření. Pro každou excitovanou molekulu chlorofylu platí, že může využít jednu ze tří možností, jak naložit s energií excitovaného stavu. Pokud je ve fotosystémech počet těchto molekul značný, je pravděpodobné, že tyto děje probíhají navzájem. Část molekul ztratí energii ve formě tepla a emise záření. Zbytek je využit v procesech fotochemických. Poměr využití těchto možností je dán aktuálními podmínkami prostředí. Pokud je list fotosynteticky aktivní, pak využije převážnou část energie při fotochemických dějích a zbylé dvě možnosti skoro nevyužívá. Závislost mezi fluorescencí a rychlostí je nepřímá. Intenzita fluorescence je nízká pokud roste rychlost fotosyntézy, a naopak. Pokud je rostlina vystavena nepříznivým podmínkám či stresu, platí jiná závislost rychlosti na intenzitě [8].

### 2.1.8 Vlivy na průběh fotosyntézy

Hlavní vliv na průběh má intenzita a kvalita světla. Při fotosyntéze dochází k absorpci pouze ve viditelné oblasti spektra, tedy od modré po červenou složku spektra. Ultrafialové záření má velké množství energie. Přílišné působení ultrafialového záření může způsobit poškození nebo úplný rozpad některých organických molekul.

Teplota ovlivňuje rychlost fotosyntézy. S rostoucí teplotou roste fotosyntetická produkce, ovšem jen do doby, kdy není dosaženo teplotního optima. Po překročení optima aktivita ustává. Vysoké teploty mohou způsobit rozklad enzymů a průběh fotosyntézy může být tímto zpomalen.

Pokud jsou ve vodě přítomny toxické látky (těžké kovy, herbicidy, pesticidy), mohou narušit průběh fotosyntézy nebo zcela znemožnit funkce jednotlivých aparátů. Intenzitu světla ovlivňuje také případný zákal, který je způsoben rozptylem částic ve vodě [9].

### 2.1.9 Charakterizace fotosyntézy

Celková neboli hrubá fotosyntéza je dána celkovým množstvím oxidu uhličitého, které bylo navázáno na ribulóza-1,5-bisfosfát. S ohledem na procesy, při kterých byl oxid uhličitý uvolňován (respirace, fotorespirace), se udává tzv. čistá fotosyntéza. Ta vyjadřuje množství oxidu uhličitého, který v rostlině zůstane vázán v organických sloučeninách.

Rychlost čisté fotosyntézy charakterizuje fotosyntetickou asimilaci oxidu uhličitého. Může být také vyjádřena jako množství vzniklých asimilátů (jednotky hmotnosti), množství uvolněného kyslíku či spotřebovaného oxidu uhličitého (jednotky molární nebo objemové), vztaženo na jednotku plochy listu a na jednotku času. Během dne se rychlost fotosyntézy mění. Roste až do maximální hodnoty, které dosahuje během odpoledne, a poté klesá. V noci neprobíhá, dochází k uvolnění oxidu uhličitého dýcháním [2].

## 2.2 Chlorofyl-*a*

Chlorofyly jsou pigmenty ze skupiny zelených barviv. Nacházejí se v pletivech, které zajišťují fotosyntézu. Jedná se o nejdůležitější fotosyntetické pigmenty, vyskytující se v organismech prokaryotních (sinice) a eukaryotních (řasy a vyšší rostliny). Z těchto pigmentů je, z hlediska přeměny energie záření, nejdůležitější chlorofyl-*a* [10][11].

### 2.2.1 Struktura

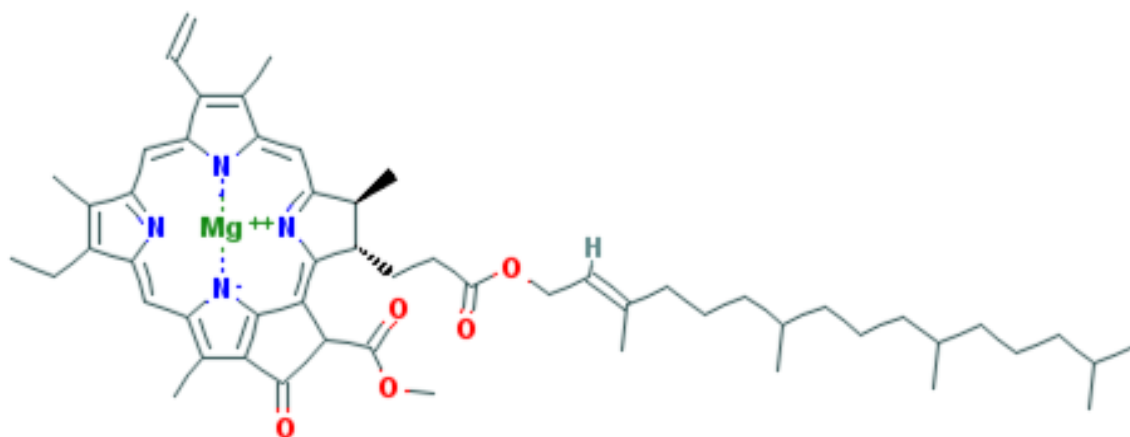
Molekula chlorofylu je tvořena porfyrinovým systémem (viz Obrázek 2), který se skládá ze čtyř pyrrolových kruhů. Tento cyklický tetrapyrrol, 17,18-dihydroporfyryl, je odvozen od protoporfyrynu IX. Struktura je podobná struktuře hemoglobinu, liší se však čtyřmi hlavními aspekty.

- Čtvrtý pyrrolový kruh je částečně redukován.
- Pátý kruh je spojen s kruhem třetím.
- Centrálním iontem je namísto železa dvojmocný kation hořčíku.
- Každá molekula chlorofylu obsahuje dlouhý řetězec - fytol, který je tvořen dvaceti uhlíky.

Záchyt kationtu hořčíku uvnitř systému umožňují volné elektrony dusíku, který je obsažen v každém z kruhů. Tyto volné elektrony jsou situovány do středu porfyrinového systému[12].

Na jednu molekulu chlorofylu-*a* připadá až tři sta sběračů, které se označují též termínem anténové pigmenty nebo jen antény. Systémy těchto antén jsou označovány jako LHC (světlosběrný komplex). Rychlost přenosu energie do reakčního centra je řádu  $10^{-4}$  s. Na absorpci fotonů se podílejí zejména  $\pi$ -elektrony systému konjugovaných dvojných vazeb molekuly chlorofylu [7].

Chlorofyl-*a* je substituován methylovými skupinami v poloze C-2, C-7, C-12 a C-18, vinylovou skupinou v poloze C-3 a skupinou ethylovou v poloze C-8. V pátém kruhu, v poloze C-13<sup>1</sup>, se nachází oxoskupina a v poloze C-13<sup>2</sup> je umístěna karboxymethylová skupina. Propionylový postranní řetězec, který je esterifikovaný diterpenovým alkoholem, je umístěn ve čtvrtém kruhu na pozici C-17 [10].



Obrázek 2: Struktura chlorofylu-*a* [13]

### 2.2.2 Vlastnosti a reakce

Chlorofyl-*a* má modrozelenou barvu. Chlorofyly absorbují záření v modrofialové a červené oblasti spektra, tedy záření o vlnové délce v rozmezí od 400 do 700 nm. Odráží záření v zelené oblasti spektra, proto se jako pigmenty jeví zeleně. Tyto pigmenty jsou nerozpustné ve vodě, ale rozpustné v nepolárních látkách.

Jedná se o nestálou látku. Po reakci se slabými alkoholovými roztoky alkálií se odštěpí fytol důsledkem hydrolyzace esterové vazby. Slabé kyseliny mohou rozrušit pyrrolová jádra. Ke změnám struktury může docházet vlivem výrazných výkyvů teplot. Největší změny byly zaznamenány v kyselém prostředí za působení tepla, kdy dochází k přeměně chlorofylu na feofytin. Degradace chlorofylů může být také způsobena a urychlena některými enzymy, působením světla a ionizujícího záření. Postupy degradace jsou sledovány zejména v průmyslu potravinářském (skladování, úprava ovoce a zeleniny) [10][11].

Na rozdíl od ligandu hemu, který je achirální, je ligand chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b* opticky aktivní. Čisté chlorofyly jsou voskovité, což je důsledkem esterové struktury fytolu. Jsou dobře rozpustné v acetonu, ethanolu či etheru [14].

### 2.2.3 Výskyt a využití

Chlorofyly patří prakticky mezi jediné zelené pigmenty, vyskytující se v přírodě v neomezeném množství. Nacházejí se především v rostlinách, řasách, některých mikroorganismech a v potravinách.

Jejich hlavní využití je v potravinářském průmyslu. Pigmenty jsou pro tento účel získávány skoro výhradně ze suchozemských rostlin a jsou jako barviva akceptovány téměř ve všech zemích. Dále lze tyto pigmenty využít například v kosmetickém průmyslu.

Chlorofyl-*a* a jiná chemická individua nemají praktického využití, protože zisk těchto pigmentů z přírodních zdrojů je nákladný a výrobek není příliš stabilní [10].

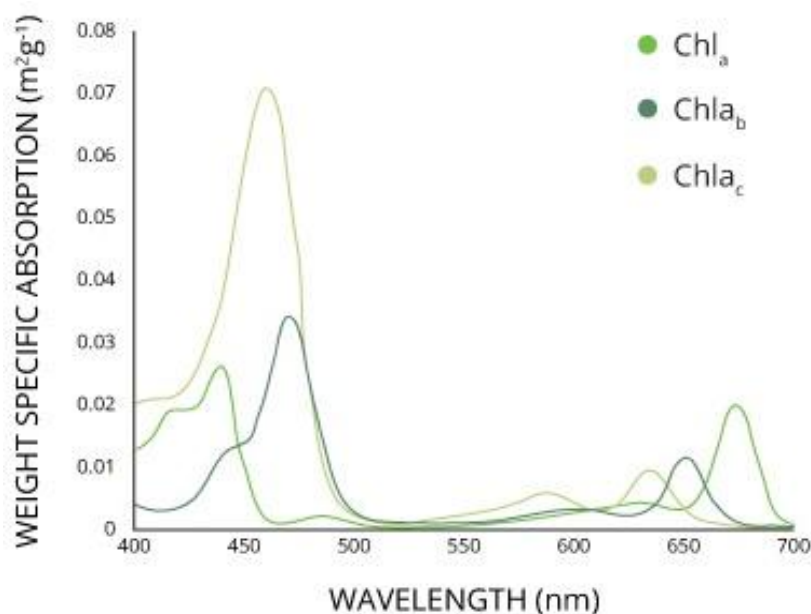
## 2.3 Ostatní pigmenty

Zatímco hlavní význam při fotosyntéze a přímý podíl na hlavních fotochemických dějích má chlorofyl-*a*, ostatní pigmenty v thylakoidech mají funkci pouze pomocnou. Podílejí se na zachytu kvant dopadajícího záření a přenosu energie excitovaného stavu na chlorofyl-*a*. Zachycují světlo o jiných vlnových délkách, a tímto rozšiřují spektrum absorbovaného záření. V této souvislosti jsou také označeny jako pigmenty pomocné, doplňkové či akcesorické. Mezi tato barviva patří ostatní typy chlorofylů, fykobiliny u sinic a ruduch, a karotenoidy [15].

### 2.3.1 Chlorofyl-*b*

Struktura chlorofylu-*b* je podobná struktuře chlorofylu-*a*, ale v poloze C-7 je místo skupiny methylové skupina formylová. Barva pigmentu je zelená [10].

Také absorpční spektrum molekul chlorofylů jsou obdobná (viz Obrázek 3). Chlorofyly absorbují v oblasti vlnových délek od 415 nm do 440 nm, která je z hlediska fotosyntézy bez většího významu. Doba života excitovaného stavu je příliš krátká, a proto tuto excitaci nelze využít pro spuštění oxidačně-redukčních procesů. Větší význam má absorpce v intervalu vlnových délek od 640 nm po 700 nm [15].



Obrázek 3: Absorpční spektra různých forem chlorofylu [16]

Společně s chlorofylem-*a* se tento pigment nachází v zelených řasách a vyšších rostlinách, avšak v sinicích, hnědých řasách a červených řasách chybí [8].

### 2.3.2 Chlorofyl-*c*

Tak jako ostatní typy chlorofylů i chlorofyl-*c* je tvořen porfyrinem obsahujícím hořčík. Barva tohoto typu chlorofylu je žluto-zelená. K absorpci světla dochází v intervalu od 600 do 640 nm. Chlorofyl-*c* se vyskytuje v organismech žijících ve vodním prostředí, v řasách rodu *Phaeophyta*, *Pyrrophyta* či *Xanthophyta* a další [10][17].

### 2.3.3 Karotenoidy

Karotenoidy jsou složeny z izoprenových jednotek. Patří do skupiny tetraterpenů a jsou tvořeny čtyřiceti uhlíkovými atomy. Jsou rozpustné v nepolárních rozpouštědlech a absorbují záření v oblasti od 480 do 570 nm. Doplnují záření ve žlutozelené části spektra. Zbarvují pletiva rostlin žlutě, oranžově, červeně či hnědě. Jsou poměrně odolné vůči běžným vnějším vlivům, například působení redukčních činidel či změně pH [7][11].

V buňkách listů se nachází až 90 % karotenoidů. Obvykle se jedná o směs karotenů (20 až 40 %) a jejich oxidačních produktů (60 až 80 %). Největší množství ve směsi karotenů tvoří  $\beta$ -karoten (až 70 %) [7][11].

Mezi tyto pigmenty, vyskytující se v listech vyšších rostlin, patří kromě  $\beta$ -karotenu lutein, neoxantin, violaxantin, zeaxantin a anteraxantin [8].

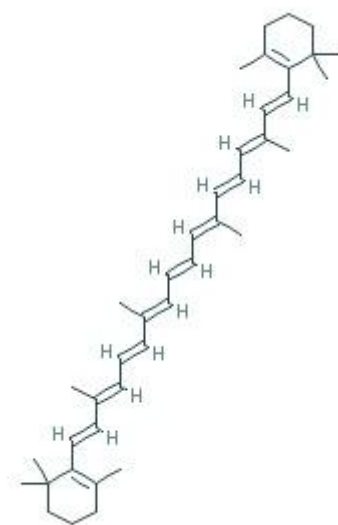


Karotenoidy jsou také považovány za ochranné látky. Tím, že zachytí excitační energii a přebytečnou energii přemění na teplo, chrání chlorofyl před fotooxidací. Při nadměrném ozařování dochází ke změně violaxantinu na zeoxantin [11].

Karotenoidy lze rozdělit na dvě skupiny – karoteny a xantofyly [10].

### Karoteny

Mezi karoteny patří lykopen, acyklický polynenasycený uhlovodík. Jedná se o nejjednodušší prototyp karotenů. Dalšími zástupci jsou hydroderiváty lykopenu, fytofluen, fytoen a dle struktury cyklu pojmenované karoteny například  $\beta$ -karoten (viz Obrázek 4) [10].



Obrázek 4: Struktura  $\beta$ -karotenu [13]

### Xantofyly

Xantofyly jsou přirozeně se vyskytující pigmenty, které vznikají oxidací karotenů. Jsou produkovány rostlinami a mikroorganismy. V listech jsou nejběžnějšími pigmenty lutein, neoxantin a violaxantin [18].

#### 2.3.4 Fykobiliny

Jedná se o pigmenty zástupců *Cyanophyta*, *Rhodophyta* a *Cryptophyta*. Na rozdíl od chlorofylů, jsou chromofory fykobilinů pevně vázány na bílkovinnou složku. Jsou tedy ve vodě rozpustné. Tvoří se biliproteiny – fykoeritriny a fykocyaniny. Jsou produkovány rostlinami a mikroorganismy. V listech jsou nejběžnějšími pigmenty lutein, neoxantin a violaxantin [8][18].

## **2.4 Stresové faktory a adaptace rostliny**

Působení vnějších faktorů může zapříčinit změny v organismu. Tyto změny, vyvolané stresorem, jsou schopny spustit sled adaptačních reakcí. Termínem stresor jsou označovány jakékoliv vlivy vnějšího prostředí. Průběh reakcí na podněty má tři stádia – stádium šoku, odolnosti a vyčerpání. Stádium šoku nastává ihned po kontaktu se stresorem. V organismu dochází k dějům, které jsou nespecifické a směřují hlavně k zachování života. Pro stádium odolnosti je charakteristické využití mechanismů k potlačení účinku specifického faktoru. Rostlina se vyrovnává s působením stresoru. Stádium vyčerpání nastává po intenzivním či dlouhodobém působení stresoru, kdy se organismus již nedokáže vypořádat s nepříznivými vlivy. Tato fáze vede až k úhynu organismu [19].

### **2.4.1 Teplotní stres**

Teplotní optimum, tedy interval teplot, při kterých probíhá optimální růst a vývin rostlin, je pro každý druh jiný. Stres rostliny mohou způsobit vysoké teploty, chlad i teplota pod bodem mrazu. Většina vyšších rostlin spadá do skupiny mezofilů, prospívajících v teplotním intervalu od 10 do 30 °C. Teploty v rozmezí od 44 do 55 °C způsobují úhyn rostlin, u sukulentů se udává teplota až 65 °C. Stupeň poškození je závislý také na délce vystavení extrémním teplotám. Většina změn potom souvisí s rozpadem cytoskeletu a změnou fázového přechodu membránových lipidů. Stres z chladu způsobují nízké teploty. Jedná se o interval teplot od 0°C do 10 °C. Stres z mrazu je spojen s tvorbou ledu v pletivech rostliny. Jde o děj velmi podobný stresu z nedostatku vody či zasolení, protože je spojen s dehydratací buňky [8].

Adaptace na teplotní extrémy souvisí se schopností přizpůsobit obsah buněk koncentrováním protoplazmy a tvorbou stresových proteinů. Rostlina se přizpůsobuje také velikostí semen. Druhy, které mají malá semena, jsou lépe přizpůsobeny vysokým teplotám než druhy s velkými semeny [20].

### **2.4.2 Vodní stres**

Dle schopnosti adaptace na množství vody je možné rozdělit rostliny do několika kategorií. Mezi ně patří hydrofyta (vodní rostliny), hygroyta (mokřadní a bahenní rostliny), mezofyta (rostliny se středními nároky na množství vody v půdě) a xerofyta (rostliny, které akceptují nedostatek vláhy po většinu roku). Vodní stres, způsobený nedostatkem vody, se projevuje zpomalením či úplným zastavením růstu nebo vadnutím rostliny. Nedostatek vody způsobuje, že je rostlina více náchylná k dalším stresovým faktorům (např. růstu teploty). Vodní deficit je způsoben nedostupností vláhy, která může vznikat na základě různých příčin. Mezi tyto příčiny patří období sucha, zasolení půdy (vyšší obsah rozpuštěných látek v půdě), transpirace či velmi nízké teploty. Základem adaptace je tvorba vhodného kořenového systému a snížení jevu transpirace. Některé rostliny jsou schopné vylučovat do okolí látky bránící klíčení semen jiných rostlin, jakožto konkurujících organismů. K redukci výdeje vody transpirací dochází

zmenšením plochy listu. Pokud ovšem rostlina dosáhla plné velikosti ještě před obdobím deficitu, může dojít k opadu listů. Snižovat výdej vody lze zavíráním průduchů. Tento děj vede ke snížení rychlosti čisté fotosyntézy, protože omezuje dostupnost oxidu uhličitého a snižuje možnost výdeje tepla. Naopak při nadbytku vody, ke kterému dochází například při záplavách, je primární příčinou stresu nedostatek kyslíku [2].

#### **2.4.3 Znečištění atmosféry**

Mezi nepříznivé faktory ohrožující rostliny patří plynné imise a vzdušné škodliviny. V důsledku spalování paliv jsou v atmosféře obsaženy různé druhy polutantů. Mezi nejzávažnější patří oxid uhličitý, oxid dusičitý, oxid siřičitý, amoniak, ozón a halogenovodíky. Primární kontakt s atmosférou je zajištěn plochou listu. První změny postihují strukturu chloroplastů a aktivitu enzymů. Poškození membránových systémů chloroplastů vyvolává působení ozónu, ještě více toxického v kombinaci s expozicí s ostatními imisemi. V důsledku oslabení ozonové vrstvy působí na rostliny i větší množství UV záření. Mezi ochranné mechanismy lze zařadit xanthofylový cyklus nebo fluorescenci. Tento cyklus je spuštěn při nadměrném ozáření. Následek fotoinhibice je pokles celkové produkce a fotosyntetické aktivity [8].

#### **2.4.4 Nepříznivé půdní faktory**

U půdy se jedná především o hodnotu pH. U půd s nízkou hodnotou pH, tedy u půd kyselých, je pozorována především inhibice růstu rostlin. Mezi časté důsledky kyselosti patří zvýšená koncentrace některých kovů. V takových půdách lze předpokládat výskyt hliníku, manganu či vodíku. Naopak snížená koncentrace se očekává u některých kationtů, například u hořčíku a vápníku. Lze pozorovat také stres z nedostatku vody. Alkalické půdy, které mají vysoké hodnoty pH, jsou také doprovázeny vodním stresem. Oproti kyselým půdám obsahují vysoké koncentrace uhličitanu vápenatého. Dalším typem jsou půdy zasolené, obsahující zvýšený obsah rozpustných solí. Nepříznivými faktory jsou nízké až růst inhibující koncentrace železa, zinku, fosforu a někdy i manganu [8].

#### **2.4.5 Biotické faktory**

Tyto stresory jsou biologické povahy. Jedná se zejména o negativní působení patogenů (viry, houby, mikroby) nebo o konkurenci mezi některými druhy rostlin. Mezi biotické stresory lze zahrnout i poškození rostliny způsobené živočichy. U rostlinných patogenů jsou projevy působení označeny termíny onemocnění či choroba. Průběh je u každé rostliny jiný. Některé rostliny jsou poměrně odolné a onemocnění se ve větší míře neprojeví [2].

#### **2.4.6 Působení toxických látek**

Kromě plyných polutantů mají negativní dopad také toxické kovy. Jedná se zejména o olovo, kadmium a zinek, které se dostávají do půdy z kontaminovaných odpadních vod,

hnojiv a usazením prachu z průmyslové výroby a automobilové dopravy. Vstupem do buněk inaktivují některé enzymy. Mohou inhibovat dělení a růst buněk, což je prvotním znakem působení toxinů. Příjem toxických látek nemusí ovlivnit jen kořeny rostlin, ale i jejich nadzemní části. Některé rostliny jsou schopné znesnadnit vstup látek do cytozolu například vylučováním organických kyselin a sorpcí na pektinové látky. Mezi další možnosti patří tvorba sloučenin, schopných tyto toxiny inaktivovat vazbou do chelátových komplexů. Tyto sloučeniny jsou označovány termínem fytochelatiny. Jedná se o malé polypeptidy příbuzné tripeptidu glutationu [4].

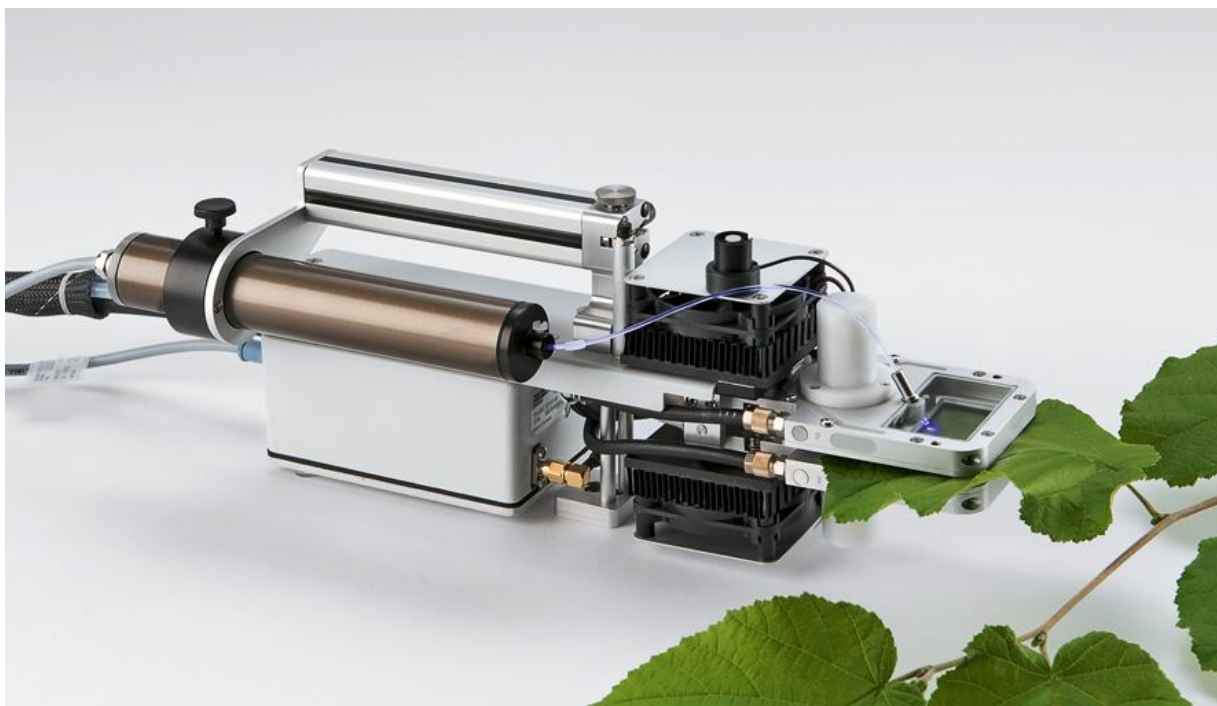
## **2.5 Stanovení chlorofylu-*a***

Metody stanovení jsou založené na vlastnostech chlorofylu-*a*. Pro analýzu je vhodné používat spektrometrické metody. Kromě absorpce záření lze využít fluorescence chlorofylu, kdy po excitaci dochází k emisi záření. Dále lze využít i některé chromatografické techniky, nejčastěji HPLC. Tyto metody mají svá pozitiva i negativa. Bylo zjištěno, že se od sebe výstupy jednotlivých metod mohou lišit [21][22].

### **2.5.1 Stanovení fluorimetricky**

Fluorescence chlorofylu-*a* je využívána už delší dobu jako indikátor působení stresových faktorů na fototrofní organismy, vodní i pozemské. Fluorescence poskytuje přehled o celkovém stavu organismu a umožňuje mapovat fotochemické procesy, které jsou s fotosyntézou spojeny. Expozice toxickými látkami má důsledek ve změně chlorofylu-*a*. S tímto je spojen vliv na fotosyntetické procesy. K tomuto měření jsou určeny přístroje – fluorimetry [23].

K měření fluorescence chlorofylu přímo v listech slouží fluorimetr PAM (viz Obrázek 5). Měření tímto způsobem musí být prováděno po obou stranách listu. Měření na horní straně listu poskytuje neúplné informace o fluorescenci jen části chloroplastů [24].



Obrázek 5: Fluorimetr PAM [25]

### 2.5.2 Separace metodou HPLC

Separaci fotosyntetických pigmentů je možné provést vysoce účinnou kapalinovou chromatografií. HPLC umožňuje účinnou a rychlou separaci pigmentů. V zelených částech rostlin se nevyskytují jen samotné pigmenty, ale i různé formy pigmentů. U karotenoidů se jedná jak o karoteny a xanthofyly, tak i o jejich *cis* či *trans* izomery. HPLC umožňuje rychlou separaci a identifikaci více než dvaceti pigmentů a dalších látek, esterů a izomerů. Spojení technik separace vysoce účinnou kapalinovou chromatografií a spektrofotometrické detekce umožnilo kvalitativní a kvantitativní jednokrokové stanovení. V chromatografii se využívá systému obrácených fází [26][27] [28].

### 2.5.3 Metoda průtokové injekční analýzy

Metoda průtokové injekční analýzy byla použita pro stanovení koncentrace chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b* ve špenátových listech. První krok zahrnoval separaci pigmentů extrakcí rozpouštědlem. V tomto postupu byla testována čtyři rozpouštědla - diethylether, methanol, aceton a ethanol. Pro účely FIA je optimální využití ethanolu o čistotě 96 %. Optimální podmínky pro stanovení chlorofylu jsou průtoková rychlost 10,84 ml, objem vzorku 1,45 ml a délka reaktoru 63 cm. K detekci bylo využito snímání vlnových délek v intervalu mezi 649 a 665 nm. Koncentrace byla měřena ve třech vývojových stádiích rostliny (in vitro, aklimatizace a v dospělosti). Výsledky byly porovnávány se závěry jiné metody s odchylkou méně než 5 %. Metoda je vhodná především pro stanovení nízkých koncentrací pigmentů v malých objemech vzorků [29].

## 2.6 Spektrofotometrické stanovení chlorofylu-*a*

Spektrofotometrie je založena na absorpci elektromagnetického záření spojené s excitací elektronů a elektronovými přechody. Spektra v UV-VIS oblasti odpovídají přechodům z nižší energetické hladiny na hladinu energeticky vyšší. Každému elektronu, který je excitovaný, odpovídá soustava pásů. Délka doby, ve které je molekula v excitovaném stavu, je přibližně  $10^{-9}$  s. Poté se prostřednictvím deexcitačních přechodů, ať už zářivých nebo bez emise záření, vrátí zpět do základního stavu. Se změnou elektronových hladin je také spojena změna vibračních a rotačních stavů [30].

### 2.6.1 Kvantitativní analýza

Pro kvantitativní analýzu se používá Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad 1)$$

kde  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ],  $l$  je délka kyvety [cm] a  $c$  je koncentrace analytu [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ].

Bouguer-Lambert-Beerův zákon platí pro monochromatické záření a pro nízké koncentrace absorbujících složek. Hodnota absorbance je úměrná počtu částic, schopných v roztoku absorbovat záření, a závisí na jejich povaze [31][32].

### 2.6.2 Kvalitativní a vícesložková analýza

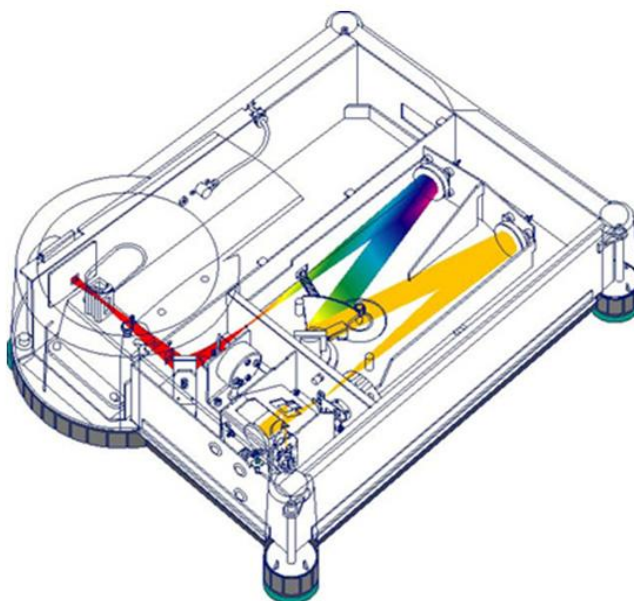
Výsledná křivka neboli absorpční spektrum slouží k vyhodnocení charakteristiky analytu, mezi něž patří hodnocení průběhu, polohy a počtu absorpčních maxim ve spektru. Poloha absorpčního pásu souvisí se strukturou látky. Větší počet extrémů ve spektru může být zapříčiněn několika důsledky. Ve vzorku může být přítomna směs absorbujících látek nebo se může jednat o následek většího počtu elektronových přechodů v molekule.

$$A = \varepsilon_1 \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot c_2 + \varepsilon_n \cdot c_n \quad 2)$$

Průběh křivky absorpčního spektra závisí na koncentraci analytu a délce kyvety. Pokud jsou v analytu přítomny složky více látek schopných absorpce, absorbance je pak dána součtem jednotlivých komponent analytu [32].

### 2.6.3 Instrumentace

Spektrofotometr se skládá z několika částí (viz Obrázek 6). Zdrojem spojitého záření je deuteriová výbojka. Tyto zdroje záření jsou vhodné pro blízkou ultrafialovou oblast. Pro viditelnou oblast jsou používány žárovky halogenové či wolframové. Záření je polychromatické, je složeno z paprsků o různých vlnových délkách. Zařízení, které rozloží vstupující záření na jednotlivé paprsky a vybere paprsek o příslušné vlnové délce, se nazývá monochromátor. Je složen z více částí. Záření vstupuje do monochromátoru vstupní štěrbinou, jejíž spektrální šířka je u jednoduchých přístrojů přibližně 10 nm, u jiných až 0,01 nm. Měla by být alespoň pětikrát menší než polovina šířky měřeného absorpčního pásu. Dalším článkem jsou čočky nebo zrcadla, která ze záření vytvoří rovnoběžný svazek paprsků.



Obrázek 6: Schéma spektrometru [33]

K absorpci záření dochází v kyvetách, které mohou mít různé velikosti a různé tloušťky absorbující vrstvy. Volba kyvety se odvíjí od analytu, který je stanoven. Kyveta nesmí ovlivnit absorbanci záření vzorkem. Pro viditelnou oblast se používají skleněné kyvety, pro oblast ultrafialovou se volí kyvety křemenné. Detekce je provedena pomocí fotoelektrických detektorů [31].

#### 2.6.4 Extrakční spektrofotometrie

Extrakční spektrofotometrie využívá extrakci ke zkoncentrování a izolaci analytu. Extrakce je prováděna vhodným organickým rozpouštědlem. V řadě případů může úprava vzorku a extrakce větším počtem menších objemů zvýšit citlivost stanovení [31].

Při extrakci chlorofylu-*a* lze využít různých druhů rozpouštědel. Každé rozpouštědlo je specifické a má odlišnou účinnost extrakce. Lze využít i směsi rozpouštědel například aceton a propanol. Bylo pozorováno, že tato směs v poměru 1:1 zvyšuje hodnotu absorbance, a proto byla během dalších měření upravena. Možné je také využít chloroform (také v poměru s jinými rozpouštědly). Jedná se však o látku s karcinogenními účinky na organismus [34] [35].

Aceton je již dlouhou dobu používaným a účinným rozpouštědlem. Metoda využití acetonu pro extrakci chlorofylu je známá jako metoda Arnonova. Fragmenty listů jsou třeny v misce s tloučkem za přídavku 80% acetonu a jemného písku. Poté je extrakt odstředěn v centrifuze, upraven na potřebný objem a spektrofotometricky stanoven [36].



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo nasazení ekotoxikologického testu a posouzení účinku vybrané látky na množství chlorofylu a biomasy. Test byl aplikován na rostlinu okřehek menší (*Lemna minor*). Po dobu sedmi dnů byl vystaven různým koncentracím dichromanu draselného. Po skončení testu byly lístky spočteny pro vyhodnocení biomasy a následně třeny v třecí misce. Za přídavku uhličitanu hořečnatého a acetonu byl pigment extrahován. Obsah chlorofylu byl následně stanoven spektrofotometricky.

## **4 PRAKTICKÁ ČÁST**

### **4.1 Rostlinný materiál a seznam chemikálií**

#### **Rostliny**

- Okřehek menší (*Lemna minor*)

#### **Chemikálie**

- Dichroman draselný (Penta, Chrudim)
- Aceton (Penta, Chrudim)
- Uhličitan hořečnatý (Lachema, Brno)
- Destilovaná voda

### **4.2 Použité vybavení a přístroje**

#### **4.2.1 Příprava ekotoxikologického testu a extrakce**

- Termoluminostat (kultivační komora, zajišťující konstantní teplotu a stálé osvětlení)
- Běžné laboratorní vybavení, třecí miska s tloučkem
- Analytické váhy SCALTEC SPB 31(max 210 g, d = 0,1 mg)
- Centrifuga Nuve CN 180

#### **4.2.2 Analýza pigmentu**

- Spektrometr SPECORD 50 PLUS
- Microsoft Office 2007

### 4.3 Postup stanovení

Okřehky jsou volně plovoucí jednoděložné rostliny patřící do oddělení rostlin krytosemenných. Jedná se o rychle rostoucí rostlinu, která je ve vodním prostředí zdrojem potravy pro malé živočichy, ryby a vodní ptactvo. Může být poškozen složkami vody nebo odpadními vodami [37]

#### 4.3.1 Příprava ředící vody (Steinbergův roztok)

Ředící voda byla připravena do odměrné baňky o objemu jeden litr. Při přípravě byly použity tyto roztoky.

1.  $\text{NaNO}_3$  ( $17,5 \text{ g.dm}^{-3}$ ),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $4,5 \text{ g.dm}^{-3}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $0,63 \text{ g.dm}^{-3}$ )
2.  $\text{MgSO}_4$  – heptahydrát ( $5 \text{ g.dm}^{-3}$ )
3.  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  – tetrahydrát ( $14,75 \text{ g.dm}^{-3}$ )
4.  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $0,12 \text{ g.dm}^{-3}$ )
5.  $\text{ZnSO}_4$  – heptahydrát ( $0,18 \text{ g.dm}^{-3}$ )
6.  $\text{NaMoO}_4$  – dihydrát ( $0,044 \text{ g.dm}^{-3}$ )
7.  $\text{MnCl}_2$  – tetrahydrát ( $0,18 \text{ g.dm}^{-3}$ )
8.  $\text{FeCl}_3$  – hexahydrát ( $0,76 \text{ g.dm}^{-3}$ ),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  – dihydrát ( $1,5 \text{ g.dm}^{-3}$ )

Roztoky 1 až 3 byly dávkovány v množství 20 ml na  $\text{dm}^{-3}$ , roztoky 4 až 8 byly dávkovány v množství 1 ml na  $\text{dm}^{-3}$ . Na výsledný objem byla odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou. Roztok byl důkladně promíchán.

#### 4.3.2 Nasazení testu

Do každé kádinky bylo napipetováno takové množství dichromanu draselného o koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$ , aby výsledná koncentrace po doplnění ředící vodou na 100 ml byla 10, 20, 40, 80 a  $160 \text{ mg.dm}^{-3}$ . Test byl proveden ve dvou opakováních. Do každé kádinky byl napipetován příslušný objem ředící vody.



Obrázek 7: Dichromanová řada pro nasazení testu

Do připravených kádinek s dichromanem a do kontrolní kádinky s ředící vodou bylo převedeno vždy devět lístků okřehku. Důraz byl kladen na to, aby byl v každé kádince rovnocenný počet lístků o přibližně stejné velikosti. Takto připravená dichromanová řada s okřehkem byla umístěna do termoluminostatu. Kádinky byly překryty miskami. Délka expozice byla 7 dní, kádinky byly po tuto dobu udržovány při teplotě  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  a intenzitě osvětlení 6 500 až 10 000 lux.



Obrázek 8: Připravený test

### 4.3.3 Extrakce rozpouštědlem

Bylo naváženo 0,03 – 0,05 gramů čerstvých lístků. Navážka byla převedena do třecí misky. V misce byly lístky třeny s přídavkem uhličitanu hořečnatého (dvě špachtličky cca 0,1 gramů) a se 3 mililitry 80% acetonu. Tření bylo ukončeno, když byly rozdrceny všechny lístky z navážky. V misce již nebyl žádný pevný zelený podíl. Takto připravený extrakt byl převeden do malé kádinky. Třecí miska byla několikrát vymyta malým množstvím 80% acetonu. Z kádinky byl extrakt převeden do malé odměrné baňky (objem 10 ml). Kádinka byla vymyta 80% acetonem. Odměrná baňka byla doplněna 80% acetonem po rysku a ponechána před stanovením ve tmě. Stejný postup byl opakován u všech extrakcí pro různé koncentrace.

### 4.3.4 Stanovení chlorofylu spektrofotometricky

Obsah odměrných baněk byl převeden do centrifugačních zkumavek. Zkumavky byly centrifugovány po dobu 5 minut.

Vzorky byly po odstředění proměřeny v kyvetách o optické délce 1 cm na spektrofotometru SPECORD 50 PLUS v intervalu vlnových délek od 380 do 750 nm proti referenci 80% acetonu. Hodnoty absorbance pro vlnové délky 645 nm a 663 nm byly dosazeny do rovnic pro výpočet koncentrace chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b*.

$$\begin{aligned}\text{Chl}_a (\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}) &= 12,25 \cdot (A_{663} - A_{750}) - 2,79 \cdot (A_{647} - A_{750}) \\ \text{Chl}_b (\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}) &= 21,50 \cdot (A_{647} - A_{750}) - 5,10 \cdot (A_{663} - A_{750})\end{aligned}\tag{3}$$

Výsledek je v jednotkách  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  extraktu. Tato data byla přepočtena na množství pigmentů ku hmotnosti čerstvých lístků v jednotkách  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [38].

### 4.3.5 Test inhibice růstu okřehku menšího *Lemna minor*

Test inhibice byl vyhodnocen v souladu s normou ISO 20079:2005. Podmínky testu byly stejné. Na začátku a na konci testu bylo sečteno množství lístků a příslušné hodnoty byly dosazeny do rovnic pro výpočet inhibice růstu biomasy porovnáním růstových rychlostí.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 Porovnání extrakce ethanolem a acetonem

Před nasazením ekotoxikologického testu byla extrakce provedena dvěma rozpouštědly – ethanolem a acetonem. Za účelem porovnání těchto rozpouštědel byla navážka lístků okřehku třena v misce s tloučkem za přídavku malého množství cca 0,1 gramů písku. Tření se provádělo hůře a bylo poměrně hlučné. S ohledem na malý povrch lístků a celkově malé navážky nebylo potřeba přidávat písek ke tření. Před každým třením byl do misky přidán uhličitán hořečnatý, který zbraňuje přeměně chlorofylu na feopigmenty. Absorpční spektra obou rozpouštědel byla hodnotově podobná. K dalším extrakcím byl vybrán 80% aceton.

### 5.2 Výsledky extrakce chlorofylu

Po ukončení expozice byly lístky okřehku naváženy na analytických vahách. Možné navážky se pohybovaly okolo 0,036 gramů. Navážka v kontrole mohla překročit hodnotu 0,04 gramů. Hmotnosti jednotlivých navážek zobrazuje Tabulka 1.

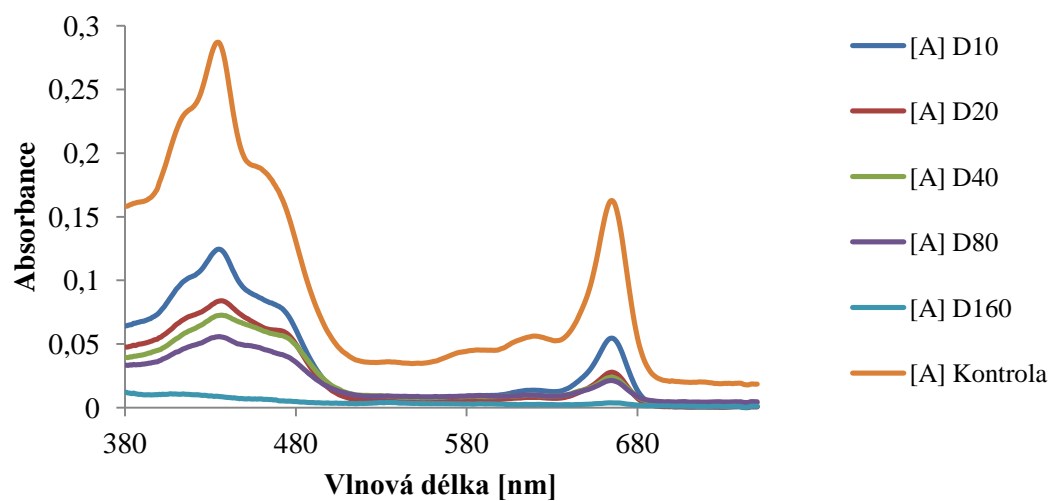
Tabulka 1: Navážka listů pro extrakci

c ( $K_2Cr_2O_7$ ) [mg.dm <sup>-3</sup> ]	0	10	20	40	80	160
Navážka [g]	0,0479	0,0357	0,0354	0,0365	0,0369	0,0351

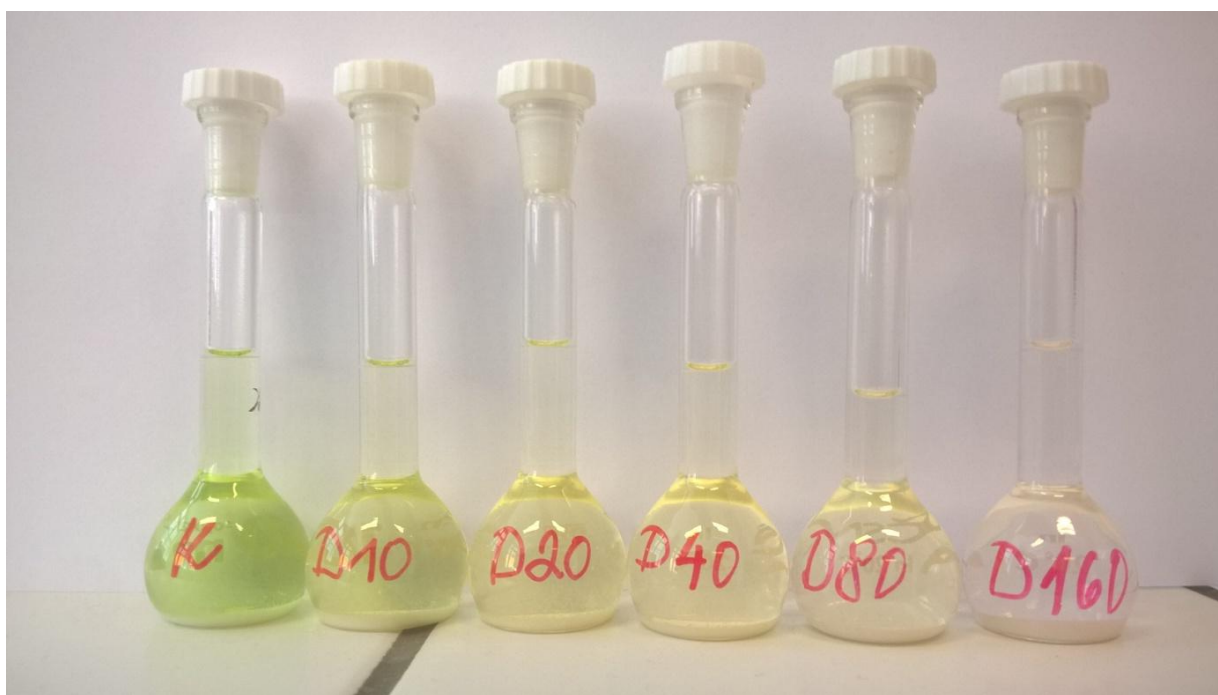
Připravené navážky byly zpracovány v třecí misce a poté převedeny do odměrných baněk (viz Obrázek 9). Extrakt byl po centrifugaci spektrofotometricky proměřen. Hodnoty absorbance při vlnových délkách 647, 663 a 750 nm uvádí Tabulka 2. Absorpční spektra jednotlivých extraktů zobrazuje Graf 1.

Tabulka 2: Hodnoty absorbance

c ( $K_2Cr_2O_7$ ) [mg.dm <sup>-3</sup> ]	0	10	20	40	80	160
A [663]	0,1597	0,0536	0,0273	0,0234	0,0211	0,0038
A [647]	0,0761	0,0228	0,0128	0,0134	0,0128	0,0025
A [750]	0,0186	0,0006	0,0009	0,0035	0,0047	0,0012



Graf 1: Závislost absorbance na vlnové délce



Obrázek 9: Odměrné baňky s extrahovanými pigmenty

Po dosažení hodnot absorbance do vzorců pro výpočet koncentrace obou extrahovaných pigmentů – chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b*, byly stanoveny hodnoty obsahu pigmentů v jednotkách  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Výsledky uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3: Výsledky množství pigmentu v  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$

c ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) [ $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	0	10	20	40	80	160
Chl- <i>a</i> [ $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	1,5681	0,5873	0,2902	0,2162	0,1783	0,0282
Chl- <i>b</i> [ $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	0,5166	0,2070	0,1212	0,1114	0,0905	0,0147

Tyto výsledky byly vztaženy na hodnoty navážky a přepočteny na jednotky  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . Výsledky zobrazuje Tabulka 4.

Tabulka 4: Výsledky množství pigmentu po přepočtu na  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

c ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) [ $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	0	10	20	40	80	160
Chl- <i>a</i> [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	0,3274	0,1645	0,0820	0,0592	0,0483	0,0080
Chl- <i>b</i> [ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	0,1079	0,0580	0,0342	0,0305	0,0245	0,0042

### 5.3 Výsledky testu inhibice růstu okřehku

V každé kádince byl sečten počet lístku na začátku a konci testu. Výsledné množství lístků v každé koncentraci bylo dáno součtem počtu lístků ve třech kádkách. Výsledky testu inhibice růstu uvádí Tabulka 5.

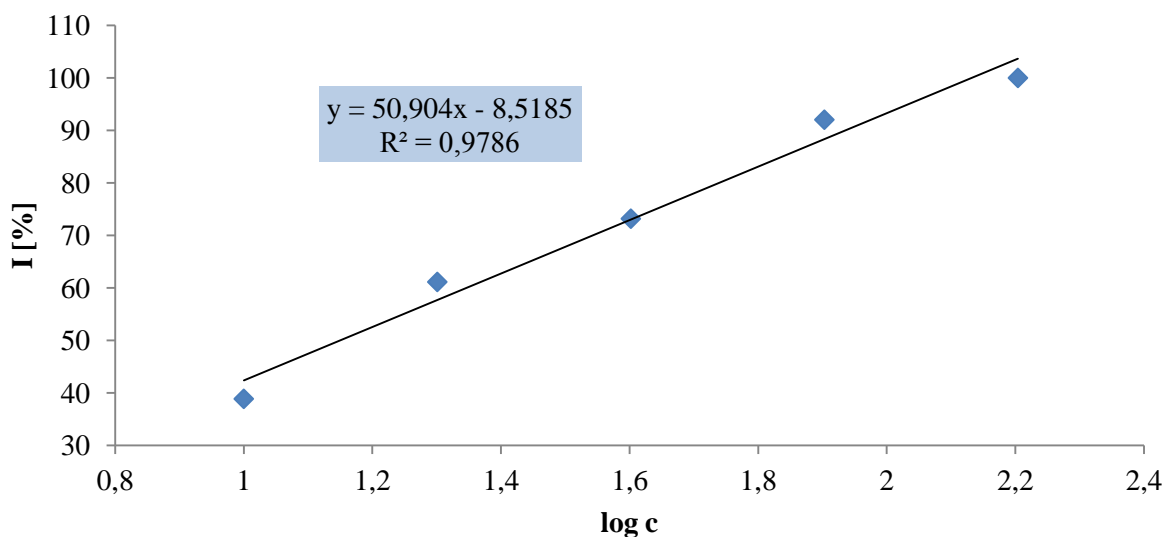
Tabulka 5: Výsledky testu inhibice růstu okřehku

c ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) [ $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	0	10	20	40	80	160
$N_n$	153	78	53	43	31	27
$\mu$	0,0103	0,0063	0,0040	0,0028	0,0008	0,0000
I [%]	–	38,84	61,12	73,17	92,04	100,00



Kde  $N_n$  je součet lístků ve třech kádinkách,  $\mu$  je růstová rychlost a  $I$  je hodnota inhibice růstu biomasy.

Získané hodnoty byly vyneseny do grafu závislosti logaritmické hodnoty koncentrace dichromanu draselného na inhibici růstu biomasy (viz Graf 2). Z rovnice lineární regrese byla vypočtena hodnota logaritmu koncentrace při 50% inhibici 168hIC50.



Graf 2: Graf závislosti logaritmu koncentrace na inhibici růstu biomasy

Test inhibice růstu biomasy je platný, pokud jsou splněna následující kritéria.

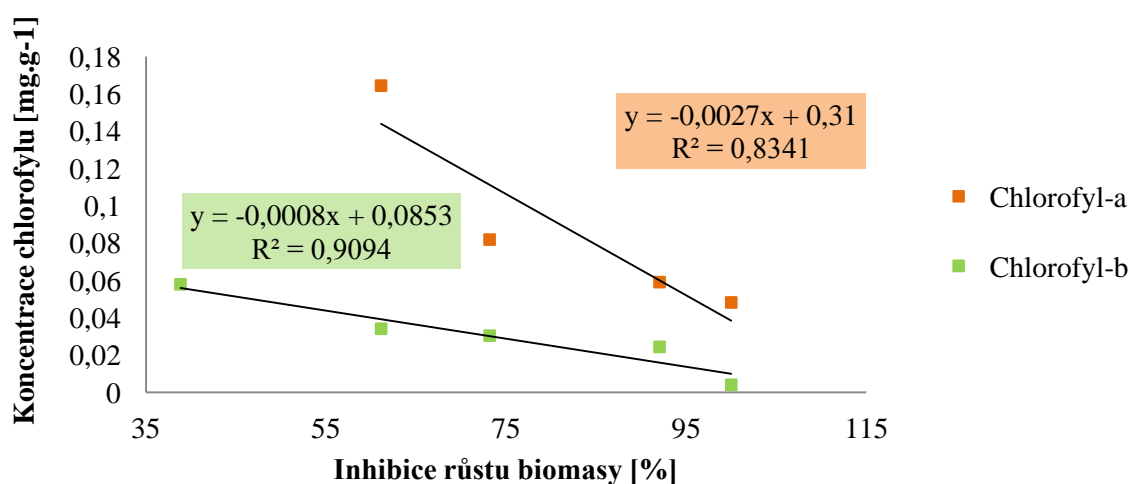
- Počet lístků v kontrole vzrostl po dobu testu na sedminásobek.
- Zjištěná hodnota 168hIC50 dichromanu draselného je v rozsahu od 10 až 60  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Po odlogaritmování byla stanovena hodnota 168hIC50 na 11,67  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Daná hodnota leží ve vymezeném intervalu. Test je platný.

## 5.4 Porovnání růstové inhibice a obsahu chlorofylu

Výsledky obsahu chlorofylu v jednotkách  $\text{mg.g}^{-1}$  byly vyneseny do grafu a korelovány s hodnotami inhibice růstu biomasy (viz Graf 3).

Z grafu č. 3 je patrné, že výsledky vlivu dichromanu na oba sledované endpointy spolu výrazně korelují. Odzkoušená metoda stanovení chlorofylu se tedy jeví jako vhodné rozšíření obvyklých vyhodnocovacích metod ekotoxikologických testů dříve používaných v ekotoxikologických laboratořích FCH.



Graf 3: Graf korelace obsahu chlorofylu v  $\text{mg.g}^{-1}$  a inhibice růstu biomasy v procentech

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce byla literární rešerše, nasazení ekotoxikologického testu a stanovení účinku vybrané sloučeniny na rostlinu okřehek menší (*Lemna minor*). K posouzení účinku byla vybrána extrakčně spektrofotometrická metoda stanovení množství pigmentů – chlorofylu-*a* a chlorofylu-*b*. Dále byl proveden test inhibice růstu biomasy. Expoziční doba byla 168 hodin a koncentrace testované látky dichromanu draselného činila 0, 10, 20, 40, 80 a 160 mg.dm<sup>-3</sup>.

Stanovení chlorofylu metodou extrakční spektrofotometrie je poměrně časově nenáročné. Nejvíce času zabere tření lístků v misce s tloučkem. Extrakce lístků z jedné navážky (tedy 0,03 – 0,05 gramů) trvá přibližně 30 až 45 minut. Ostatní postupy přípravy vzorku (vážení, centrifugace) trvají řádově několik minut. K extrakci byl použit 80% aceton. Toto rozpouštědlo bylo vybráno s ohledem na dobrou účinnost extrakce a četné použití při extrakci pigmentů.

Test inhibice růstu biomasy je kombinovatelný s metodou stanovení chlorofylu. Výsledkem testu je stanovení koncentrace, při které dochází k 50% inhibici růstu. Oba testy lze provádět paralelně, protože podmínky nasazení a doba expozice jsou shodné. Výhodou spojení těchto metod je více získaných informací o působení sledované sloučeniny na organismus.

U obou testů bylo prokázáno, že jsou vhodné k posouzení účinku ekotoxikologických sloučenin. Stanovení koncentrace chlorofylu potvrdilo, že působení toxických látek má vliv nejenom na růst a reprodukci daného organismu, ale také na děje v organismech probíhající. Koncentrace chlorofylu-*a* i chlorofylu-*b* klesala s rostoucí koncentrací dichromanu draselného.

Další částí výzkumu by mohla být aplikace obou testů na některé další komerčně dostupné chemikálie či výrobky běžné spotřeby a posouzení jejich vlivu.

## 7 BIBLIOGRAFIE

- [1] *Encyclopedia Britannica* [online]. 2017 [cit. 2017-05-28].
- [2] PAVLOVÁ, Libuše. *Fyziologie rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0985-1.
- [3] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-7157-313-2.
- [4] PROCHÁZKA, Stanislav. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998. ISBN 80-200-0586-2.
- [5] BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Pavel KOTRBA. *Základy biologie*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-587-0.
- [6] Chloroplast. In: *Biology* [online]. b.r. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <http://biologyirem.weebly.com/chloroplast.html>
- [7] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [8] MASAROVÍČOVÁ, Elena a Miroslav REPČÁK. *Fyziológia rastlín*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2002. ISBN 80-223-1615-6.
- [9] *Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny* [online]. b.r. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.sinice.cz/>
- [10] VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin 3*. 1. vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 342 s. ISBN 80-902391-2-9.
- [11] KINCL, Miloslav a Václav KRPEŠ. *Základy fyziologie rostlin*. 2. dopl. vyd. Ostrava: Montanex, 2000. ISBN 80-7225-041-8.
- [12] GARRETT, R. a Charles M. GRISHAM. *Biochemistry*. 5th ed. Belmont, CA: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2013. ISBN 978-1-133-10629-6.
- [13] *PubChem* [online]. b.r. [cit. 2017-05-05]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [14] KLAPROTH, Anne, Maria NAJDANOVA, Mirjana MINCEVA, Dieter SICKER, Hans-Ullrich SIEHL, Klaus-Peter ZELLER a Stefan BERGER. Chlorophyll. *Chemie in unserer Zeit* [online]. 2016, **50**(4), 260-274 [cit. 2018-02-26]. DOI: 10.1002/ciuz.201600751. ISSN 00092851. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ciuz.201600751>
- [15] SOFROVÁ, Danuše. *Biochemie: základní kurz*. 3. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-7184-936-7.
- [16] *Fundamentals of Environmental Measurements* [online]. Fairborn: FONDRIEST ENVIRONMENTAL INC., 2016 [cit. 2018-02-19]. Dostupné z: <http://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/algae-phytoplankton-chlorophyll/>

- [17] YAMANO, Nami, Tadashi MIZOGUCHI a Ritsuko FUJII. The pH-dependent photophysical properties of chlorophyll- c bound to the light-harvesting complex from a diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2017, , - [cit. 2018-03-06]. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2017.09.047. ISSN 10106030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1010603017311176>
- [18] BHOSALE, Prakash a Paul S. BERNSTEIN. Microbial xanthophylls. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2005, **68**(4), 445-455 [cit. 2017-11-07]. DOI: 10.1007/s00253-005-0032-8. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-005-0032-8>
- [19] RAJCHARD, Josef. *Základy ekologické fyziologie obratlovců: obecné zákonitosti interakce organismu a faktorů prostředí, vliv fyzikálních, chemických a potravních faktorů*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1999. ISBN 80-7040-351-9.
- [20] BRESTIČ, Marián, Katarína OLŠOVSKÁ a Pavol HAUPTVOGEL. *Život rastlín v meniacich sa podmienkach prostredia: evolučná perspektíva pre 21. storočie*. V Tribune EU vyd. 1. Brno: Tribun EU, 2008. Librix.sk. ISBN 978-80-7399-566-9.
- [21] GREGOR, J a B MARŠÁLEK. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research* [online]. 2004, **38**(3), 517-522 [cit. 2017-04-11]. DOI: 10.1016/j.watres.2003.10.033. ISSN 00431354. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135403006067>
- [22] *Cyanobakterie ...: biologie, toxikologie a management : sborník konference ... Brno*. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2004. ISBN 8090320384.
- [23] RALPH, P. J., R. A. SMITH, C. M. O. MACINNIS-NG a C. R. SEERY. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicological & Environmental Chemistry* [online]. 2007, **89**(4), 589-607 [cit. 2018-02-02]. DOI: 10.1080/02772240701561593. ISSN 0277-2248. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772240701561593>
- [24] LICHTENTHALER, H. K., C. BUSCHMANN a M. KNAPP. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio RFd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica* [online]. 2005, **43**(3), 379-393 [cit. 2018-02-12]. DOI: 10.1007/s11099-005-0062-6. ISSN 0300-3604. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11099-005-0062-6>
- [25] PAM-Fluorometer 3050-F. In: *Walz* [online]. Effeltrich: Heinz Walz GmbH, 2018 [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: [http://www.walz.com/products/gas\\_exchange/gfs-3000/fluorometer\\_3050-f.html](http://www.walz.com/products/gas_exchange/gfs-3000/fluorometer_3050-f.html)
- [26] SCHOEFS, Benoît, Martine BERTRAND a Yves LEMOINE. Separation of photosynthetic pigments and their precursors by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a photodiode-array detector. *Journal of Chromatography A* [online]. 1995, **692**(1-2), 239-245 [cit. 2018-03-06]. DOI: 10.1016/0021-9673(94)01066-N. ISSN 00219673. Dostupné z:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739401066N>

- [27] HU, Xueyun, Ayumi TANAKA a Ryouichi TANAKA. Simple extraction methods that prevent the artifactual conversion of chlorophyll to chlorophyllide during pigment isolation from leaf samples. *Plant Methods* [online]. 2013, **9**(1), 19- [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1186/1746-4811-9-19. ISSN 1746-4811. Dostupné z: <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-9-19>
- [28] FRIGAARD, Niels-Ulrik, Kim L. LARSEN a Raymond P. COX. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 1996, **20**(2), 69-77 [cit. 2017-11-07]. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1996.tb00306.x. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.1996.tb00306.x>
- [29] LOPEZ, J. Design of a flow injection method for chlorophyll determination in in vitro plants. *Talanta* [online]. 2004, **64**(5), 1304-1308 [cit. 2018-02-05]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.06.002. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914004003418>
- [30] SVĚTLÍK, Jan. *Molekulová spektroskopie a optické metody*. 1. vyd. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-2173-7.
- [31] NĚMCOVÁ, Irena, Petr RYCHLOVSKÝ a Ludmila ČERMÁKOVÁ. *Spektrometrické analytické metody*. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 802460776x.
- [32] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 8021417420.
- [33] Schéma spektrometru. In: *Katedra chemie FPV UCM* [online]. b.r. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://kchfpv.weebly.com>
- [34] LAN, Shubin, Li WU, Delu ZHANG, Chunxiang HU a Yongding LIU. Ethanol outperforms multiple solvents in the extraction of chlorophyll-a from biological soil crusts. *Soil Biology and Biochemistry* [online]. 2011, **43**(4), 857-861 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.12.007. ISSN 00380717. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071710004633>
- [35] ERGUN, Emel, Birsen DEMIRATA, Gulcin GUMUS a Re?at APAK. Simultaneous determination of chlorophyll a and chlorophyll b by derivative spectrophotometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2004, **379**(5-6), - [cit. 2018-02-03]. DOI: 10.1007/s00216-004-2637-7. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-004-2637-7>
- [36] NIKOLOPOULOS, Dimosthenis, Christina KORGIOPOULOU, Kyriakos MAVROPOULOS, Georgios LIAKOPOULOS a George KARABOURNIOTIS. Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. *Talanta* [online]. 2008, **76**(5), 1265-1268 [cit. 2018-02-04]. DOI: 10.1016/j.talanta.2008.05.037. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914008004268>
- [37] KOČÍ, Vladimír a Klára MOCO VÁ. *Ekotoxikologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká

škola chemicko-technologická, 2009. ISBN 978-80-7080-699-9.

- [38] KACÁLEK, Dušan, Ondřej ŠPULÁK, Jan VÍTÁMVÁS a Ivan KUNEŠ. Fluorescence chlorofylu, chemismu a obsah fotosynteticky aktivních pigmentů u listů buků vápněných do jamky. *Zprávy lesnického výzkumu* [online]. 2011, **56**(4), 301-309 [cit. 2018-05-07]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/23604637-Fluorescence-chlorofyluchemismus-a-obsah-fotosynteticky-aktivnich-pigmentu-u-listu-buku-vapnenych-dojamky.html>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

---

ATP	Adenosintrifosfát
FAR	Fotosynteticky aktivní radiace
FIA	Průtoková injekční analýza
HPLC	Vysoce účinná kapalinová chromatografie
LHC	Light-harvesting complex
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
PSI	Fotosystém I
PSII	Fotosystém II
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa

---